

b. ウイルスの遺伝子検出(LAMP法)^{1,2)}

現在のところ、日本で臨床診断薬として承認されているものは、栄研化学のLoopamp SARS コロナウイルス検出試薬キットのみである。SARS コロナウイルスの replicase 領域内に設定した6種類のプライマーを使用しているため、他のヒトコロナウイルスなどと交差反応を起こさず、特異性が高い。

汚染を防ぐために安全キャビネット内で操作、またマイクロ遠心機もバイオシールドのローターを使用する(バイオセーフティレベルBSL2)。また、他試料とのコンタミネーションを防ぐための注意は、他の遺伝子検査と同様である。

直前にバッファーをエタノールなどで調整しておく。

1.5ml チューブに buffer AVL/carrier RNA 540 μ l, 試料 140 μ l を入れ、キャップを閉めボルテックス攪拌混和、10分間室温孵置後、遠心、エタノール、バッファーなど添加、遠心など繰り返す、RNAを抽出する。

以下の操作は循環型クリーンベンチを使用、手袋を着用する。

試料、陽性、陰性コントロール分のマスターミックスを調整し、使用まで氷上保存する。試料、マスターミックスを混合し、遠心する。チューブを62-63°C、45分間反応させ、次に80°C、5分間加温して反応を停止させる。

LA-320C制御ソフトを起動し、測定条件を設定し、濁度を測定する。簡易にチューブ底面から紫外線(254-366nm)を照射し、目視してもよい。

c. 血清IgG抗体価(ELISA法)³⁾

血清を熱非動化した後はBSL2で施行してよい。血清を段階希釈してリコンビナントのSARS-CoVウイルスN蛋白とU274でコートしたマイクロプレートに蒔いて37°Cに孵置する。抗ヒトIgGおよび基質(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)を加えて反応させた後、450nm, 620nmの吸光度を測定する。我が国では臨床診断用には販売されていないが、Generalabs Diagnostics Pte. Ltd.(Singapore)社製の診断キットは、抗原としてリコンビナントSARS-CoV蛋白N、

U274を用いている。本キットは、同患者の急性期ウイルス分離、RT-PCRによる遺伝子診断の結果および著者らの6カ月後の血清抗体価の結果と一致し、特異性、感度とも十分に診断に堪える。

5. 基準値

正常：ウイルス分離陰性、RT-PCRによるウイルス検出陰性、血清抗体価陰性。

動物のコロナウイルスには交差反応はないとされている。

6. 生理的変動(測定に影響を及ぼす因子)

試料の採取時期がキーポイントである。潜伏期(無症状期)にはウイルスは分泌されない。発熱、筋肉痛、全身倦怠などの前駆期もウイルス分泌は微量で、これらの時期のウイルス分離やRT-PCRが陰性でも、SARSは否定できない。

7. 臨床的意義(異常値を示す疾患)

当初は通常SARSの保因者はないと考えられていた。したがって陽性の場合にはSARSの確定診断となる。

LAMP法の場合、上述のように他のヒトコロナウイルス、腸コロナウイルス、ネコ、イヌ、ウシ、ウサギ、ラットなど他種のコロナウイルス、マウス肝炎ウイルス、ブタ伝染性胃腸炎ウイルスなどとも交差反応は起こさず、また陽性反応的中率(positive predictive value)も高いため、陽性と判定された場合は確定診断である。しかし、negative predictive valueは低いいため、陰性であってもSARSは否定できない。したがって、Loopamp SARS コロナウイルス検出試薬キットはSARSを否定するための鑑別診断に用いてはならない。WHOの定義によるSARS患者の糞便では81.0%、鼻咽頭拭い液で56.3%の陽性率であった。

ELISAによる抗体検査の場合は、特異性、感度の点から、ペア血清の場合、否定診断にも用いられる。抗体は長期にわたる持続が確認されているので、回復期以降の血清であれば、1ポイントでも診断し得る。また1シーズン前の呼

吸器疾患の鑑別にも用いることができる。著者らの調査では、濃厚接触で感染予防策を講じた場合でも6.3%程度の不顕性感染を認めた³⁾(表1)。また不顕性感染は濃厚接触しなくてもあり得るが、その場合の血清抗体価は低い。

8. 関連検査項目

10日以内の流行地の渡航歴，検査室・研究室勤務歴，発熱，乾性咳嗽，呼吸困難など主要症状，胸部X線写真などが診断の基本である。

急性呼吸器症状を呈するマイコプラズマ，インフルエンザ，RSウイルスなど他の病原微生物の抗原あるいは抗体検査を行う。

表1 ELISAによる血清抗SARS-IgG抗体³⁾

施設(注)	検査人数	陽性人数	陽性率
A病院	148	60	40.5%
(発症者)	44	44	100%
B病院	127	8	6.3%
C病院	50	1	2.0%
合計	325	69	21.2%

注：A病院は輸入SARS患者1人に端を発し，職員は濃厚接触あり，病院感染が多発した。B病院はA病院から転送されたSARS患者を除く。職員は濃厚接触あるも，感染予防策を講じた。C病院はB病院と同じ敷地内であるが，SARS患者の入院はない。

■文献

- 1) Loopamp SARS コロナウイルス検出試薬キット説明書，栄研化学，2003.
- 2) 田代真人：迅速診断法の開発，科学技術振興調整費「SARSの診断及び検査手法等に関する緊急調査研究」成果報告書，2004.3.
- 3) Kirikae T, et al: Detection of antibodies against SARS-associated coronavirus in patients and healthcare workers at three hospitals following the 2003 Hanoi outbreak. FEMS Microbiology letters, 2004.

病院感染対策の基本
組織としての対応を理解する

倉 辻 忠 俊

臨 床 医

Vol. 31 No. 8 別 刷

2 0 0 5 年 8 月 10 日 発 行

中 外 医 学 社

組織としての対応を理解する

倉辻 忠俊

感染症は微生物の身体への侵入が発症原因であるが、宿主の防御機構（解剖学的構造および免疫能・感受性）の他に宿主の生活する環境（施設の構造および運営システム）が重要な因子となっている。そのため環境感染の観点から、病院感染を管理する必要がある。すなわち、施設の空調などの構造・設備の改善や運営方針の決定など、組織として病院感染に対応しなければならない。また、病院感染の防止は、感染発症や感染伝播に対する個人個人の知識と医療技術が基礎とはなるが、一部の職員の油断が二次感染拡大に直接つながることからも、組織としての対応が重要である。種々の規程や管理を決める感染対策委員会 Infection Control Committee (ICC) と、実働部隊である感染対策チーム Infection Control Team (ICT) が大きな役割を果たす。

ICCとICT, リンクナースの存在意義と役割

病院感染は、「医療事故の1つ」であるとの認識により、患者および職員の安全管理の観点から病院長の諮問機関である各種委員会の1つではなく、病院長直属の組織とすることが望ましい。すなわち、ICCの委員長は病院長もしくは看護部長など管理職が担当し、その委員会での議決がそのまま直接組織としての決定事項となり、即座に実行へと移される体制である。そのために、委員会のメンバーには、感染症や微生物学の専門家以外に、予算執行の責任者である会計課長や種々の条例解釈や規程の担当である庶務課長などの事務職員、外来、手術室、検査室、薬剤部などの責任者が入っていることが好ましい。したがって、ICC

くらつじ ただとし/国立成育医療センター研究所所長

の委員は個人名による指名ではなく、役職で決めることが重要である。

現場での指導や相談対応はICTが行うことになる。現場でのマニュアル、手順書の活用、問題が発生した場合の相談と対処方法など、即座に対応しなければならない場合もあるため、少なくとも数人の専任は必要であろう。また、マニュアルの定期的見直しや改定、抗菌薬の使用指針、分離菌の種類と抗菌薬感受性の推移の情報発信、ターゲットサーベイランス実施と評価、職員・出入り業者への教育研修など、ICTの役割は多種にわたり、また重要である。ICTの提案はICCで承認されなければならない。

病院感染は、外来の待合室等でも二次感染という形で発生することもあるが、通常は入院後48時間以降に発症した感染で、感染症の潜伏期に入院したものを除くということになっている。したがって、病院感染の舞台は病棟ということになるが、一番患者に接し観察しているのは医師でなく看護師である。そのために最前線の感染管理はリンクナースがキーパーソンとなる。リンクナースとICTの連携とそれらの役割を、職員が充分に理解してはじめて実効性を発揮する。

運営方針

職員の健康管理は、感染の伝播の観点とともに感染源の観点からも、病院感染対策の第一歩である。職員採用時の健康診断では既往歴や予防接種歴の確認が重要で、特に結核、麻疹、水痘など空気感染する疾患、B型肝炎など事故により感染する疾患に関しては本人の申請だけでなく胸部X線写真や血清抗体価などで客観的に確認し、結核予防法や労働基準法などの条例に規程のない対応

の決定は、組織としてなされる必要がある。特に臓器移植を行う施設や制がん剤やステロイド剤などを多用するがん患者や自己免疫疾患患者を多く取り扱う施設について、欧米では臓器移植学会など学術団体やCDCなどが学術論文を根拠としてだしている勧告やマニュアルで規定している。たとえば、水痘の既往のない、または予防接種をしていない、あるいは水痘の予防接種をしていても接種後6週間経過していない職員の移植病棟への配属禁止は、移植患者が水痘に罹患した場合の死亡率および死亡しなくても軽快するまでの患者の苦痛・負担と医療経済学などの論文を根拠としている¹⁾。日本では老健施設などでの患者および職員に対するインフルエンザ予防接種は、日本では条例にはないが、厚生労働省および地方自治体から接種奨励の通達がでている。

手術室の下足履き替え問題、内視鏡検査の消毒方法、ディスプレイ製品の採用なども施設として、どの根拠を用いるのか、どのように対処するのかは組織の方針を決める必要がある。

面会者の制限、盲導犬の導入、ペット、切花・植木などの植物、食べ物などの許可も施設および組織として方針を決める必要がある。CDCはこれらの問題に関して、たとえば盲導犬など動物は禁止するのではなく、そのようにすれば許可できるという条件をあげている²⁾。

設 備

空気感染によって感染伝播する疾患の対応は、その施設の構造および運営方針が大きな要素になる。結核、麻疹、水痘、アスペルギルス症など空気感染する疾患管理は、施設の構造と空調システムによるところが大きい。特に多剤耐性結核には陰圧病室管理が好ましい。また、小児病棟やがん病棟には陰圧・陽圧を調整できる病室設置が好ま

文 献

- 1) CDC/DHHS, Infectious Disease Society of America, American Society of Blood and Marrow Transplantation. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem

しいが、経費がかかるため、施設としての方針により決定される。欧米では、建築学会などと共同研究を行い、医療施設における構造や扉・窓の位置の基準を決めている。

洗浄水、透析室、空調の冷却塔の管理も施設としてモニターし管理する必要がある。

ゾーニングと人や物の動線に対する理解と協力

清潔・不潔（汚染）区域の設定と、それをもとにした手順の決定は、感染伝播の防止に大きな役割を果たす。ことに飛沫感染、接触感染の感染伝播経路の遮断の観点から、1つの病棟内での患者のベッド配置、病室の決定、診療・看護者の行動順番、清掃順番は、その病棟に勤務する全員が十分に理解し、動線と手順を統一しなければ効果を発揮しない。MRSAやVRE感染症の場合は特に重要である。

廃棄物の分別と種類に対する理解と協力

医療施設の廃棄物は、一般廃棄物（可燃性、不燃性）の他に、医療廃棄物、感染性廃棄物、鋭利廃棄物などに分類され、それを職員全員が十分に理解しなければならない。廃棄物は一次貯蔵場所の管理（欧米では虫や動物が入り込めない構造と管理を規定している国もある）、委託業者への周知徹底も問題になることがある。

●おわりに

病院感染は、安全な医療の提供の観点から、科学的な根拠に基づく防止対策が重要であるが、絶対という方法はないため、施設としてどのように対処するか、また医療経済学的な観点からも妥当な方法を施設・組織として理解し、実施していく必要がある。

cell transplant recipients. MMWR. 2000; 49: RR-10.

2) HICPAC/CDC/DHHS. Guidelines for environmental infection control. MMWR. 2003; 52: RR-10.

今月の主題 院内感染制御

技術解説

院内感染多発事例の分子疫学解析

関口純一郎 藤野 智子 切替 照雄

臨 床 検 査

第49巻 第6号 別刷

2005年6月15日 発行

医学書院

院内感染多発事例の分子疫学解析

関口純一郎¹⁾/藤野智子²⁾/切替照雄³⁾

〔SUMMARY〕 分子疫学解析は、EBM に基づいた院内感染対策の基礎となる手法である。その解析手段として、最も有効な手法の一つがパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)である。PFGEは、制限酵素によって切断した染色体DNAを、交互に電場をかけながら電気泳動させることで効率良く分離する方法で、複数の菌株同士が同一かどうかを判定することができる。ここでは、PFGEの技術と実際の院内感染事例の解析を述べる。〔臨床検査 49:615-621, 2005〕

〔KEYWORDS〕 院内感染多発事例解析, 分子疫学, パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)

はじめに

一定期間に、同一の医療施設内において同じ病原体による感染症が複数の患者に発生した場合、それが偶発的な同時多発なのか、あるいは医療施設内での二次的な伝播拡散によるいわゆる「院内感染」によるものなのかを見極め、適切な対策を講じることは、院内感染対策を立てるうえで重要である。さらに、今日のような薬剤耐性菌の出現が一般化した現状においては個々の状況を考慮した解析が重要となっており、それぞれの医療現場で現在発生している事例を科学的に分析し、原因菌の特定とその対策を立案していくことが肝要である。このような多発事例を解析する手段として、最も有効な手法がパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)である。ここでは、PFGEの実

際の技術を述べるとともに代表的な院内感染起因菌の疫学に用いられるいくつかの手法を解説する。

パルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE)

1. 概要

PFGEは、DNAの特定の塩基配列を認識して切断する制限酵素で細菌の染色体DNAを断片化してから、特殊な泳動装置を用いて、各電極に交互に電場をかけながら泳動させることで、大きなDNA断片を効率良く、DNA断片のサイズに従って分離する方法である。したがって、分離された2つの菌株が全く同じものであればPFGE像は全く同じ数で同じ大きさのDNA断片像を示す。2つの菌株が全く異なるものであればPFGE像も全く異なる数で異なる大きさのDNA断片像を示す。PFGEによる染色体DNAの断片像から、分離された複数の菌株が同一かどうかを判定することができる。

2. 特徴と利点

PFGEの大きな特徴は、巨大分子の染色体DNAをできるだけ細菌の核内に存在していた状態と近い状態で回収するようDNA抽出法を行うことにある。プラグ(plug)と呼ばれるアガロースブロックの中に細菌を包埋した状態ですべてのDNA抽出操作を行う。このことにより、細菌のDNAは物理的な損傷によって切断されることな

1) SEKIGUCHI Junichiro 国立国際医療センター研究所 感染症制御研究部

2) FUJINO Tomoko 同

3) KIRIKAE Teruo 同・部長

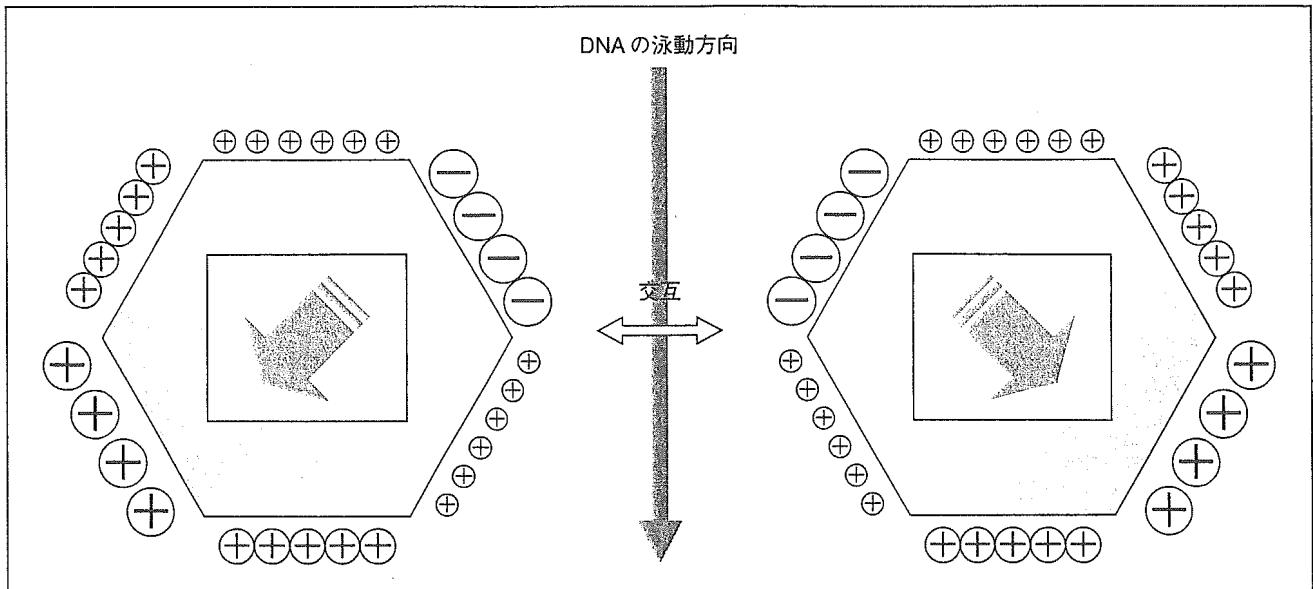


図1 電気泳動装置 CHEF (Bio-Rad Laboratories) システムの原理図

24個の電極を有する泳動槽は、電場の交差角度を変化させることにより幅広い分子量のDNA断片を高い分解能で分離可能にしている。負に帯電したDNA断片は陽極側へと移動する。

く回収される。

第2点目の特徴として、幅広い分子量のDNA断片をバンドとして認識可能にする特殊な電気泳動装置を用いることにある。PFGEで用いられる電気泳動装置は電場の交差角度(パルス角度)、泳動時間、電圧、パルスタイム(電場の方向転換の周期)を変化させることができ、これを調整することによりDNA分子をバンドとして認識可能とさせることができる。PFGEに用いる電気泳動装置CHEF(clamped homogeneous electric fields, Bio-Rad)システムの原理図を図1に示した。

3. 手順

以下にPFGEの手順と流れを記載する。ただし、菌種ごとに、溶菌に用いる酵素、制限酵素、電気泳動条件などが異なる。ここでは手順の概要を記載する。

(1) 菌の分離および増菌培養(1日目)

Brain heart infusion brothにて1晩、菌を培養。

(2) 菌体のアガロース包埋と溶菌処理(2日目)

1晩培養菌液0.5 mlを4°C、10,000 rpm、5分間遠心し、集菌後、PIVバッファ {1 mol/l NaCl, 10 mmol/l EDTA [pH 8.0]} に再浮遊さ

せる。これに、あらかじめ溶解しておいた1.5%のアガロース溶液を等量加え、プラグ作製容器(plug mold)に注入し、固める。固まったプラグをプラグ作製容器から取り出し、細菌ごとに適した細胞壁分解酵素を加え、溶菌処理を行う。さらに、RNase(RNA分解酵素)添加後、Proteinase K(蛋白質分解酵素)を加え蛋白分解処理を行う。

(3) プラグ洗浄と制限酵素処理(3日目)

蛋白質分解酵素を完全に不活性化するため、1 mmol/l phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)溶液でプラグ内溶液を置換後、再び、TEバッファ(10 mmol/l Tris-HCl, 1 mmol/l EDTA, pH 8.0)にて置換・洗浄する。次いで、制限酵素を添加し、DNAを切断・断片化する。

(4) 電気泳動(4日目)

酵素反応後、プラグを電気泳動用アガロースに埋め込み、0.8%のアガロースを加え固定する。なお、泳動用バッファには0.5×TBEバッファ(100 mmol/l Tris-HCl, 100 mmol/l Boric acid, 2 mmol/l EDTA, pH 8.0)を用いる。泳動は24時間かけて電気泳動を行う。

(5) 染色・観察(5日目)

泳動が終了したら、エチジウムブロマイドで染色し、紫外線を照射しながら写真撮影を行う。

■ メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の分子疫学解析

MRSA は現在、最も薬剤耐性化の進んだ菌種の一つであり、院内感染の原因菌としてその対策が最も必要な菌種の一つである¹⁾。

1. MRSA のパルスフィールドゲル電気泳動法

基本的には、上記に示す方法にて PFGE を行うが、黄色ブドウ球菌の場合、菌体を包埋したプラグは、厚さ 1.4 mm で作製する。Lysosyme および Lysostaphin を添加後、37°C にて 3 時間の溶菌処理を行う。同時に RNase を添加し、RNA を切断する。次いで Proteinase K を添加後、50°C にて 1 晩の蛋白質分解、PMSF 処理にて Proteinase K の不活性化の手順で行う。次いで、制限酵素による DNA の断片化を行う。黄色ブドウ球菌の PFGE に用いる制限酵素は *Sma*I が代表的である。*Sma*I で切断することにより、黄色ブドウ球菌の染色体 DNA は 15~20 断片の 10~700 kb の大きさの DNA 断片に分離される²⁾。制限酵素処理は 25°C で 1 晩反応させる。反応後、上記のようにして処理されたプラグに泳動用バッファーを添加し、電気泳動用アガロースゲルのウェル内に埋め込む。電気泳動は 14°C にて冷却しながら行い、パルス角度は 120°、泳動時間は 24 時間、電圧は 6 V/cm、パルスタイムは 5~35 秒で行う。なお、アガロースの濃度は 1% で行うことにより鮮明なバンドを得ることができる。

2. その他の分子疫学解析手法

Ribosomal RNA の相同性を比較する Ribotyping, PCR にて任意に増幅される産物の型を比較する Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD PCR), plasmid の制限酵素切断パターンを比較する plasmid fingerprinting などが利用されている。細菌の生存に必須な複数の遺伝子: housekeeping gene を PCR 増幅し、その塩基配列を比較する Multilocus sequence typing (MLST), その得られた複数の遺伝子の制限酵素切断パターンを比較する Multilocus restriction fragment typing (MLRFT) なども利用されている³⁾。また、MRSA のメチシリン耐性要因である *mecA* 遺伝子を含む領域を基に分類した

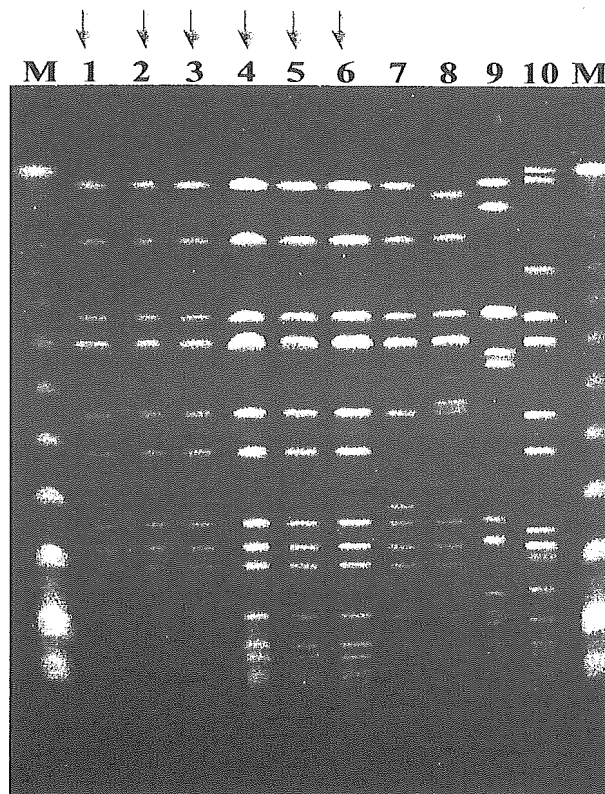


図2 PFGE を用いた NICU, 産科新生児室および一般病棟における MRSA 多発事例解析
矢印で示すレーンの分離菌株が同一であることを示している。〔文献 5) の図を一部改変〕

SCC-mec typing⁴⁾ などが知られている。

3. 解析事例⁵⁾

ある病院では、病院内の近接した場所に設置されている NICU (neonatal intensive care unit), 産科新生児室および一般小児科病棟で、ほぼ同時期に合計 5 名の MRSA 感染症が発生した。またこれらの病棟では、同時期にこれら 5 名の患者を含め、計 10 名から MRSA が検出されていた。そこで分離株の PFGE を実施した。その結果を図 2 に示す。この結果から明らかのように、NICU および産科新生児室から分離された MRSA は NICU の 1 株を除き同一であることが判明した。一方、一般小児病棟から分離された 3 株は、NICU および産科新生児室から分離された MRSA と異なった株でお互いにも異なっていた。

以上より、NICU および産科新生児室での MRSA 多発事例が明らかになった。以後、徹底した接触感染予防策によって MRSA 伝播は沈静化した。

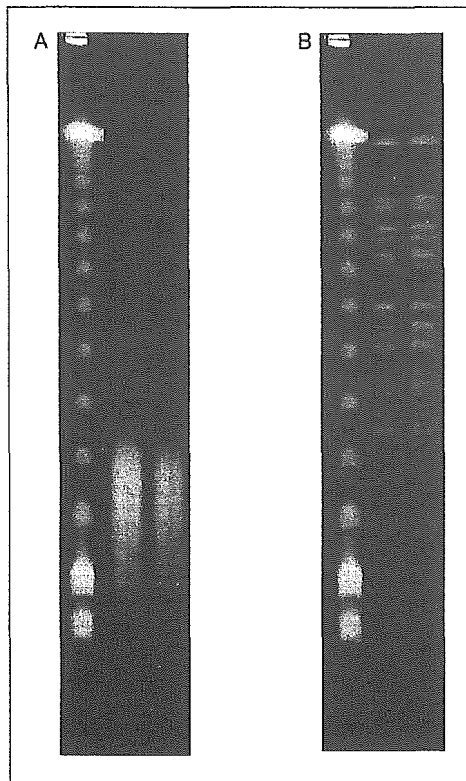


図3 緑膿菌のPFGE像
 A: Tris泳動バッファーに50 $\mu\text{mol/l}$ のチオ尿素未添加のPFGE像。
 B: Tris泳動バッファーに50 $\mu\text{mol/l}$ のチオ尿素添加後のPFGE像。

多剤耐性緑膿菌の分子疫学解析

緑膿菌はMRSAと並び院内感染の原因菌の代表であるが、近年になって多発事例の際に分離される株の多くがいわゆる多剤耐性緑膿菌であることが多く、問題をより深刻化させている。

1. 多剤耐性緑膿菌のパルスフィールド電気泳動法

緑膿菌の場合、菌体を包埋したプラグの厚さは0.7 mmで作製する。DNA断片がシャープになり泳動後のDNA断片間を認識し易くなる。制限酵素による切断までの手技は黄色ブドウ球菌と同様に行う。緑膿菌のPFGEに用いる制限酵素は*SpeI*が代表的である。*SpeI*で切断することにより、緑膿菌の染色体DNAは20~25断片の10~700 kbの大きさのDNA断片に分離される²⁾。制限酵素による切断時間は4~5時間で行うことができる。電気泳動条件は黄色ブドウ球菌と同様であるが、泳動時間は22時間で行う。

PFGEの電気泳動に用いるTris泳動バッファー中において、陽極からTrisのラジカルないし過酸化物が発生し、DNAを分解することが報告されている⁶⁾。この現象を解消するために、Tris泳動バッファーに50 $\mu\text{mol/l}$ のチオ尿素を加え、DNAの分解を抑えることができる。特に緑膿菌のPFGEにおいて効果的である。実際にPFGEによる遺伝子型解析が不可能になるものがあった(図3A)。そこで、Tris泳動バッファーに50 $\mu\text{mol/l}$ のチオ尿素を加えたところ、PFGEで結果がスマアになっていた検体においてバンドパターンを回復することができた(図3B)。

2. その他の分子疫学解析手法

緑膿菌においてもRibotyping, RAPD-PCR, さらに、染色体に内在する回文配列の繰り返しを利用したrepetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) typingなどが利用されている。

3. 解析事例

ある総合病院の1病棟で、一定期間内に5名の患者より多剤耐性緑膿菌が次々に分離されていることが臨床検査技師により報告された。これらのうち4株が日常臨床で使用するほとんどの抗生物質に耐性であった。そこで、緑膿菌を標的とした院内の環境調査が実施された。緑膿菌はシンクの1箇所、便所の2箇所、浴槽の2箇所、全自動蓄尿機2箇所から合計8株分離された。

患者由来の5株を含め環境由来の8株とともにPFGEを実施した結果、患者に由来する多剤耐性緑膿菌4株すべて、さらに、全自動蓄尿機の1箇所から分離された緑膿菌が同一のPFGE像を示した。

以上より、多剤耐性緑膿菌の多発事例が明らかになり、以後、徹底した接触感染予防策および全自動蓄尿機設置区域の重点的な環境消毒を行った結果、多剤耐性緑膿菌は沈静化した。

セラチア菌の分子疫学解析

セラチア菌は、しばしば日和見感染症を惹起し、院内感染の原因菌として重要視されている。特に、カテーテル挿入に関連した院内感染例が目立っている⁷⁾。

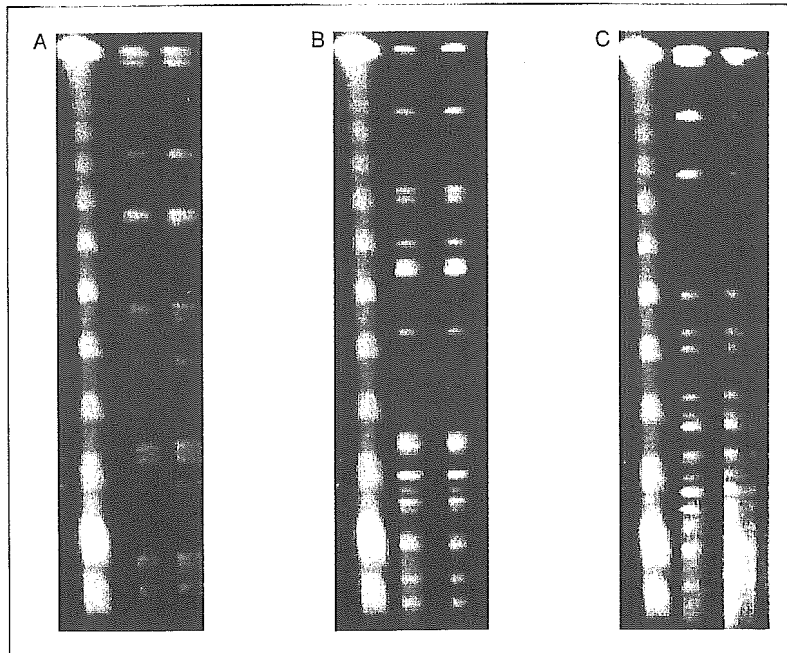


図4 PFGE を用いたセラチア菌の事例解析
異なる患者に由来する分離菌株が A, B および C のそれぞれ組み合わせ
で同一であることを示している。〔文献7〕より引用

1. セラチア菌のパルスフィールドゲル電気泳動法

セラチア菌に関しても同様に PFGE を行うことができる。溶菌処理の際、終濃度1%程度の SDS 溶液を加えることにより良好な結果が得られることがある。セラチア菌の PFGE に用いる制限酵素には *SpeI* が用いられることが多い。

2. 解析事例⁷⁾

ある病院の外科病棟において、静脈留置カテーテルを挿入されている2名の患者がセラチア菌による敗血症を次々に発症した。この事例を契機に病院全体の入院患者から分離されたセラチア菌を収集し、PFGE 解析を実施した。

契機となった外科病棟で分離されたセラチア菌の PFGE パターンは同一であった。セラチア菌は院内全体で23株分離され、20の PFGE パターンに分類された。そのうちの6株で3組の同一 PFGE パターンが同定された(図4)。同一 PFGE パターンのセラチア菌が認められた症例すべてでカテーテルの挿入が確認された。

分子疫学調査を行うことにより、個々の多発事例への対応だけでなく、院内全体における感染の実態が把握され、カテーテル挿入のようなアウトブレイクのリスクファクターを判明させることができる。

結核菌の分子疫学解析

結核菌はその細胞壁に厚い脂質を含むバリアーで覆われているため DNA の抽出が難しく、また、空気伝染の危険性から PFGE 解析は非常に困難であった。1992年、Zhang ら⁸⁾は、凍結融解を2度以上繰り返した後に菌体をプラグに包埋する技術により、PFGE が可能となったと報告している。しかしながら、すべての結核菌について PFGE 解析が可能な制限酵素が定まっておらず、実際には、染色体上に比較的安定でランダムに挿入された移動性セグメントの1種である IS や繰返しエレメント等を標的とした Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 分析が行われているのが実情である。

1. 結核菌の IS タイピング法

精製結核菌 DNA を *PvuII* で切断後、0.8%アガロース電気泳動、ナイロンフィルターへの転写、UV 固定を行い、次いで 42°C、1時間プレハイブリダイゼーション後、ペルオキシダーゼ標識プローブ DNA を加え、42°C で15時間ハイブリダイゼーションを行う。このフィルターを洗浄後、化学発光物質を加え X 線フィルム上でバンドを検出する。現在、RFLP 分析の国際基準が

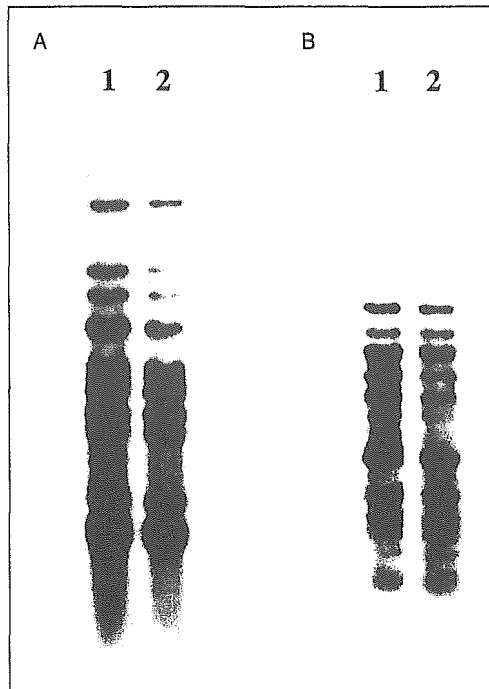


図5 IS タイピングおよび PGRS タイピングを用いた結核菌の事例解析
 A: IS6110 を標的とした RFLP 像。
 B: (CGG)⁵ を標的とした RFLP 像。分離菌株が同一であることを示している。
 [文献 11] の図を一部改変]

標準化されており、プローブは IS6110 の 246 bp の PCR 産物を用い、内部標準 DNA 分子量マーカーとして *Hae*III 消化 ϕ X 174 と *Pvu*II 消化 Supercoiled ladder DNA を使用する⁹⁾。

2. Polymorphic GC-Rich Sequence (PGRS) タイピング法

精製 DNA を制限酵素 *Alu*I で切断後、同様に転写して得られたナイロンフィルターを用いて、染色体上の CGG CGG CGG CGG CGG の 5 回繰り返しエレメント (CGG)⁵ を標的とした RFLP 分析を行うことができる¹⁰⁾。本法は IS6110 の単一コピーの菌株のための疫学的手段として極めて有効である。

3. 解析事例¹¹⁾

結核菌感染によって入院した患者とその後になってその家族から結核菌が分離された。両者から分離された結核菌の IS タイピングおよび PGRS タイピングを実施した。図に示すように、IS タイピング (図 5 A) および PGRS タイピング (図 5 B) の RFLP パターンは全く同一であった。以上

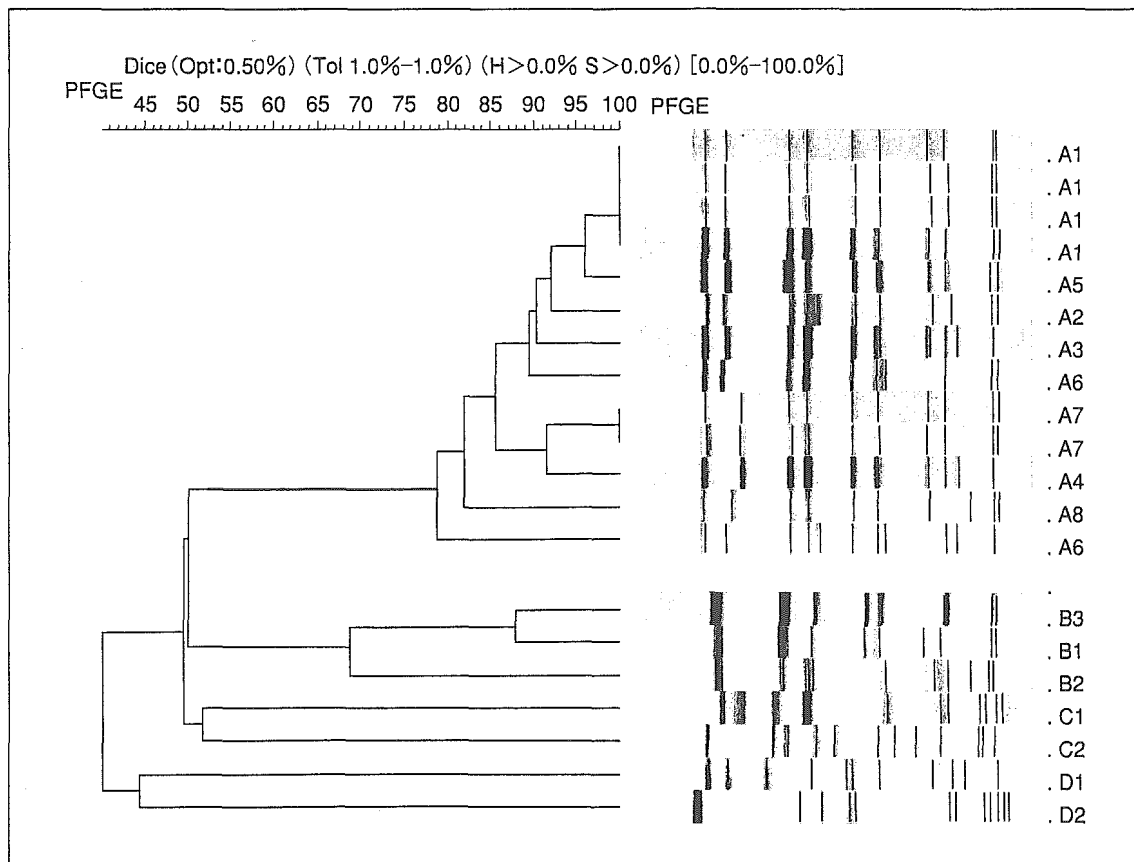


図6 PFGE 型に基づく MRSA 分離株の相同性解析
 系統樹は菌株同士の近縁関係を示している。A 群がクラスターを形成していることが明らかである。

より、結核菌の家族内感染が明らかになった。IS タイピングおよび PGRS タイピングは院内で結核菌感染があった場合も感染源追跡に有力な手段となりうる。

■ クラスタ解析

バンドパターンの相同性に基づく解析ソフト (Fingerprinting™ II, Bio-Rad) を利用することによって、客観的な解析が可能である。相同性解析の結果、複数の菌株が1つのクラスターを形成することがある (図6)。したがって、供試菌株が多発事例起因菌と同一であるかどうか、または近縁関係にあるかどうか客観的に証明される。

■ おわりに

ここでは、いくつかの PFGE を用いた多発事例解析結果を紹介したが、感染対策に少なからず寄与している。PFGE 装置は高価ではあるが、ここ数年の間に多くの研究機関で導入されており、技術的に習熟すれば日常検査における有力な武器となることは間違いない。

文 献

- 1) Fujino T, Sekiguchi J, Kawana A, et al : Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Tokyo hospital in 2003. *Jpn J Infect Dis* 57 : 83-85, 2004
- 2) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al : Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis ; criteria for bacterial strain typing. *J Clin Mi-*

crobiol 33 : 2233-2239, 1995

- 3) Shopsis B, Kreiswirth BN : Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis* 7 : 323-326, 2001
- 4) Chambers HF : The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*?. *Emerg Infect Dis* 7 : 178-182, 2001
- 5) Mori N, Fujino T, Uchida H, et al : Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in a newborn nursery, a neonatal intensive care unit, and a general pediatrics ward. *Jpn J Infect Dis* 54 : 189-190, 2001
- 6) Romling U, Tummeler B : Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 38 : 464-465, 2000
- 7) Sekiguchi J, Fujino T, Kuroda E, et al : Molecular epidemiology of *Serratia marcescens* in a hospital. *Jpn J Infect Dis* 57 : 78-80, 2004
- 8) Zhang Y, Mazurek GH, Cave MD, et al : DNA polymorphisms in strains of *Mycobacterium tuberculosis* analyzed by pulsed-field gel electrophoresis ; a tool for epidemiology. *J Clin Microbiol* 30 : 1551-1556, 1992
- 9) van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al : Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting : recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31 : 406-409, 1993
- 10) Otsuka Y, Parniewski P, Zwolska Z, et al : Characterization of a trinucleotide repeat sequence (CGG) 5 and potential use in restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 42 : 3538-3548, 2004
- 11) Takahara M, Yajima Y, Miyazaki S, et al : Molecular epidemiology of intra-familial tuberculosis transmission. *Jpn J Infect Dis* 56 : 132-133, 2003

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

今日の治療指針 2005年版

私はこう治療している

総編集 山口 徹・北原光夫

デスク判 ● B5 頁1784 2005年
定価19,950円(本体19,000円+税5%)
[ISBN4-260-10665-1]

ポケット判 ● B6 頁1784 2005年
定価15,750円(本体15,000円+税5%)
[ISBN4-260-10666-X]

臨床医が日常遭遇する疾患に対する治療法を、全診療科/1091項目にわたって網羅。各項目は第一線の専門医が執筆。項目数・執筆者数とも過去最多。また2005年版より薬剤師による服薬指導情報を掲載。日本の保険診療に沿った現時点における最新・最高の治療法を解説した実用書。

感染症シリーズ

MRSA 院内感染防止対策

切 替 照 雄

(キーワード：標準予防策，分子疫学，パルスフィールドゲル電気泳動法)

METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (MRSA)
INFECTION CONTROL IN MEDICAL CARE FACILITIES

Teruo KIRIKAE

(Key Words : standard precaution, molecular epidemiology, pulsed-field gel electrophoresis)

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は、院内感染対策上 2 つの意味で重要である。第 1 に MRSA は院内で最も高頻度に遭遇する院内感染起因菌であること、第 2 に MRSA 感染対策は、医療施設の質を知るためのもっとも客観的な指標となりえることである。黄色ブドウ球菌はしばしば皮膚や鼻咽頭粘膜に常在し、接触によって容易に伝播する性質を持っている。したがって、理想的な感染対策を実施している医療施設では、MRSA の院内伝播は発生しないはずである。本稿では、院内感染防止策の基本を簡単に紹介し、MRSA 感染対策における分子疫学手法の有用性を紹介する。

院内感染防止策の基本^{1)~4)}

感染防止の基本として、標準予防策がある^{1)~4)}。これには、生体に関わるすべての湿性物質 (血液、体液、汗を除く分泌液、排泄物、傷のある皮膚、粘膜) を感染性とみなして対応するという概念で、すべての患者に適應される。標準予防策がとられたうえで、感染経路別予防策を追加適應する 2 段階の対応が推奨されている。これには主に空気感染予防策、飛沫感染予防策と接触感染予防策がある。MRSA 感染防止策では、通常標準予防策と接触感染予防策を行う。

標準予防策の基本は手洗いであり、眼に見える汚れの

ある場合は石鹸と流水による手洗いを実施する^{2)~4)}。眼に見えない汚れの場合は、擦式消毒用アルコール製剤で手指消毒をおこなう。湿性生体物質に触れたとき、患者の介護の前後、手袋をはずした後などにこれを行う。湿性生体物質に接触することが予想される場合は手袋を着用する。使用後は外して破棄し、手洗いをする。「一処置、一手洗い」「一処置、一手袋」が原則である。生体物質が飛散する可能性がある場合は、ガウンやビニールエプロンを着用する。眼、鼻、口に汚染する可能性があるときはマスクや眼鏡を着用する。針刺し事故防止も標準予防策として重要である。基本は、リキャップをしない、感染性廃棄物専用容器へ破棄することである。このような標準予防策の考え方は、職員の講習会で繰り返し確認すべき事項である。

MRSA は標準予防策に加えて、接触感染予防策を適用すべき代表的な病原体である^{2)~4)}。同様な予防策が必要な菌として、VRE、緑膿菌や腸管出血性大腸菌 O157 などがある。湿性物質の有無に関わらず、患者ケア時には手袋などの物理的バリアを使用する。感染患者は隔離予防として個室管理が望ましいが、同じ菌の感染者を同一室に収容することはやむをえない処置である。

なお、空気感染予防策を適應すべき病原体として、結核菌、水痘・带状疱疹ウイルス、麻疹ウイルスがあり、

国立国際医療センター International Medical Center of Japan 研究所 感染・熱帯病研究部

Address for reprints : Teruo Kirikae, Department of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Research Institute, International Medical Center of Japan, Toyama 1-21-1, Shinjuku, Tokyo 162-8655 JAPAN

Received April 14, 2004

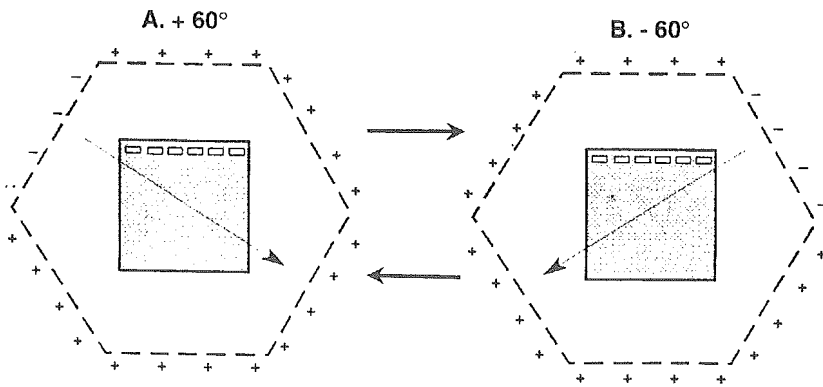


図1 パルスフィールドゲル電気泳動法の原理
 20 kbp 以上の大きさの DNA は、通常の電気泳動法では分離できない。パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) とは、左右 2 方向からの電気パルスを一一定時間毎に交互に流すことでゲノム DNA などの巨大 DNA を方向転換させゲル内をジグザグに移動させ分離する手法である。

DNA の特定の配列を認識して切断する制限酵素を用いて、細菌の DNA を断片化し電気泳動で分離する手法である。この断片化した DNA は、かなり大きい DNA 断片なので電気泳動するための特殊な装置を必要とする (図 1)。また、この方法では DNA 断片を物理的に損傷しないように菌体をあらかじめゲルに固めてから DNA 断片を調整しなければならず手間と時間がかかる解析でもある。2 つの MRSA がまったく同じものであったら同じ数で同じ大きさの DNA 断片が検出され、2 つの MRSA がまったく異なるもので

飛沫感染予防策を適用すべき病原体の代表はインフルエンザウイルスである。

MRSA の分子疫学

入院患者が次々に重症 MRSA 感染症になった場合、同じ由来の MRSA 菌株に感染したのかどうかを見極めることはその後の院内感染対策を立てるうえで重要である。このようなことを解析する手段として分子疫学がある。このうち、パルスフィールドゲル電気泳動法 (PFGE) という手法は最も有効な手段である⁴⁾。これは、

あれば DNA 断片の大きさも数も大きく異なってくる。図 2 に解析結果を示す。8 種類の MRSA のうち、矢印をつけた 3 種類がまったくおなじパターンであり、この 3 つの MRSA は同一の菌に由来していることが推定できる。このような解析方法を指紋 (フィンガープリント) 法ともいう。

具体的にこの解析方法を応用した事例を示す⁴⁾。ある病院では、1 つの看護グループが NICU と一般小児病棟を、もう 1 つの看護グループが産科病棟とそこにある新生児室を担当していた (図 3)。一方、小児科の医師

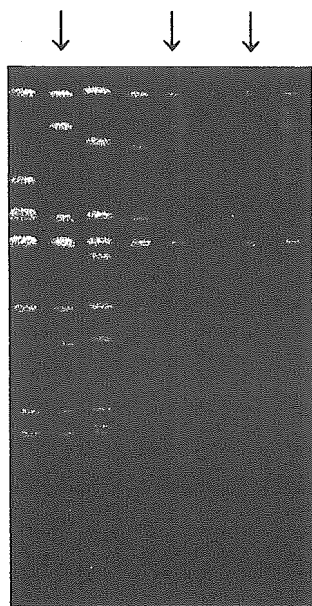


図 2 パルスフィールドゲル電気泳動法による MRSA 解析例

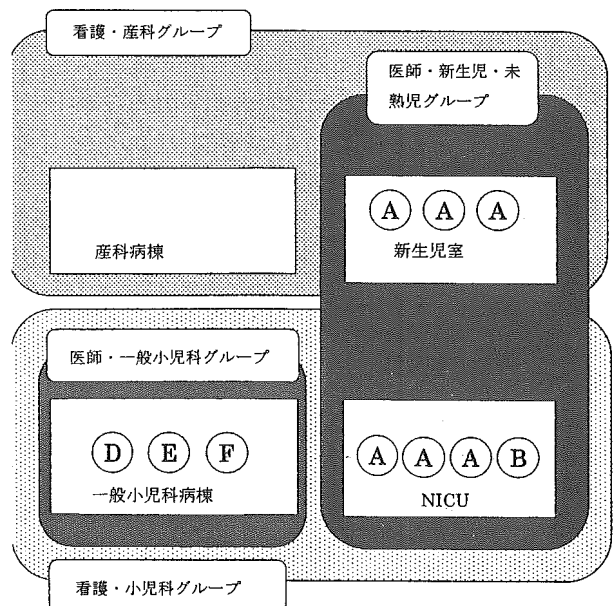


図 3 小児科病棟における MRSA 多発事例の PFGE 解析結果

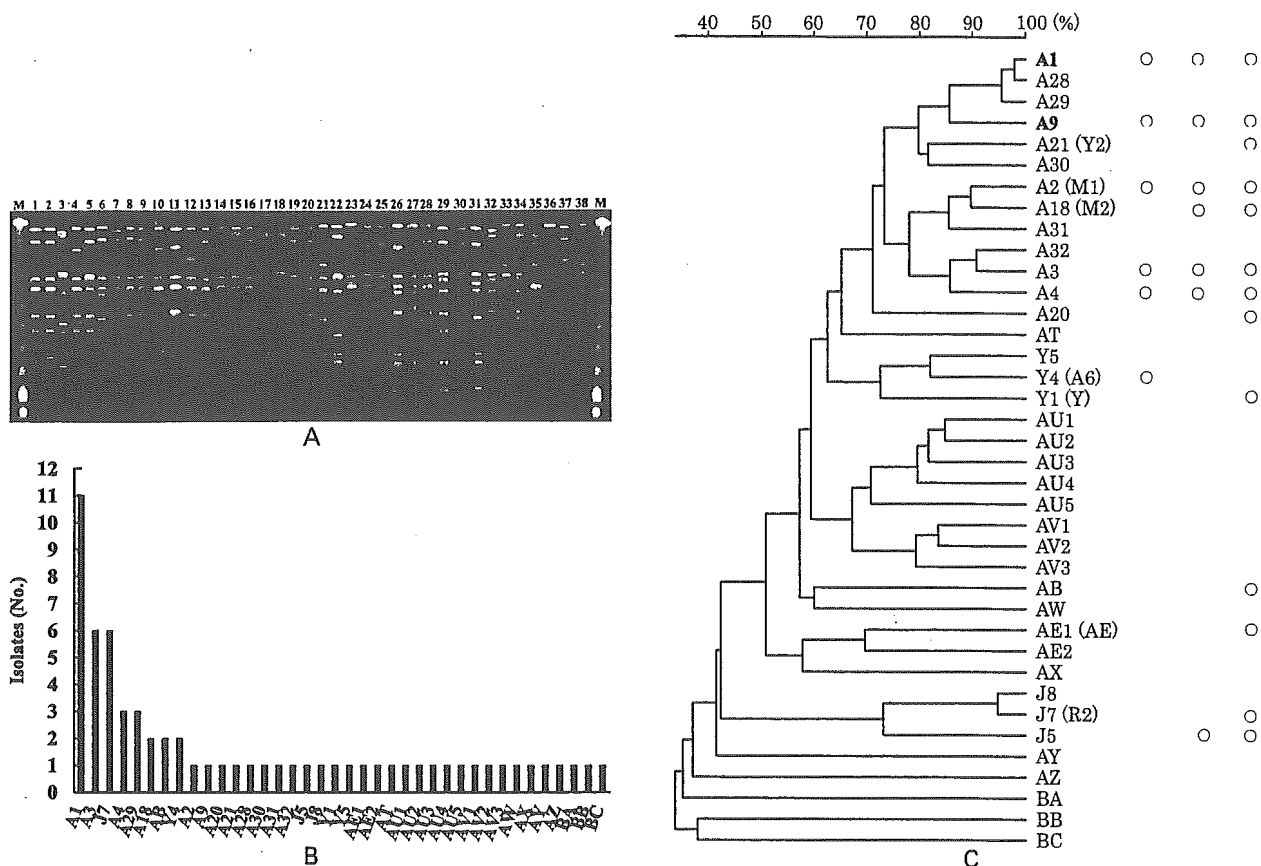


図 4 MRSA 分子疫学解析サーベイランスの結果

- A. 2003年，東京の950床の病院で38種類の PFGE パターンが検出された。
- B. これらの株の検出頻度は，数株が高頻度であったが，ほとんどのパターンが1つの分離株から検出されていた。
- C. 同病院では，同様な MRSA 分子疫学解析を2000年，2001年と2002年に実施している。それらの結果を dendrogram で解析した。2003年のサーベイランスで検出された PFGE パターンのうち，2000年-2002年にも検出された PFGE パターンに丸印を付してある。ごく一部の PFGE パターンを示す MRSA 株が院内に存在し続けていることがわかる。

グループは，一般小児科病棟と NICU および産科新生児室を担当していた。これらの病棟のうち，新生児室で結膜炎が1名，NICU で結膜炎と MRSA 肺炎がそれぞれ1名，一般小児科病棟では，敗血症と中耳炎がそれぞれ1名，合計5名の MRSA 感染症がほぼ同時期に発症した。

これらの病棟では，MRSA 感染者とその他の MRSA 保菌者を含め，合計10名から MRSA が検出されたので，これらの分離株の PFGE 解析を実施した。この結果を図3に示す。この結果から明らかなように，NICU および産科新生児室から分離された MRSA は1株を除いて同じ PFGE パターンを示し，同じ株に由来していることがわかった。一方，一般小児科病棟から分離された3株は，これとは異なりまたお互いにも異なった株であることがわかった。この解析で，NICU と産科新生児室

で拡大した MRSA 多発事例は新生児・未熟児グループの医師を介して広がった可能性が示唆された。新生児・未熟児グループの手洗いの徹底とガウンテクニックの見直しなどで，その後の MRSA 伝播は沈静化した。一般小児科病棟の MRSA 感染は，徹底した接触感染予防策によって他の患児への伝播はなかった。

このような MRSA 事例解析のほかに，ある病院には何種類の株の MRSA が存在するのか？といった基本的な質問にもこの分子疫学解析は役に立つ。この調査によって，東京の950床の病院では，約30クローンの MRSA が存在し，その多くが病院に定着しないが，ある特定の数クローンが病院に定着して院内感染の原因菌となっていることがわかってきた (図4)⁵⁾。現在，これらの MRSA 株の遺伝子タイプを解析し，微生物学的側面から MRSA 院内感染の原因遺伝子の検索を始めている。

文 献

- 1) 小林寛伊, 吉倉 廣, 荒川宜親編 (厚生労働省医薬局安全対策課編集協力) エビデンスに基づいた感染制御, 第1集, 改訂2版. 東京, メヂカルフレンド社, 2003
- 2) 小林寛伊, 吉倉 廣, 荒川宜親ほか編 (厚生労働省医薬局安全対策課編集協力) エビデンスに基づいた感染制御, 第2集. 東京, メヂカルフレンド社, 2003
- 3) 小林寛伊, 吉倉 廣, 荒川宜親ほか編 (厚生労働省医薬局安全対策課編集協力) エビデンスに基づいた感染制御, 第3集. 東京, メヂカルフレンド社, 2003
- 4) 倉辻忠俊, 吉倉 廣, 宮崎久義ほか編 (厚生労働省医政局指導課編集協力): 院内感染防止手順. 東京, メヂカルフレンド社, 2003
- 5) Fujino T, Sekiguchi J, Kawana A et al : Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Tokyo Hospital in 2003. *Jpn J Infect Dis* 57 : 83-85, 2004
(平成16年4月14日受付)

Medical Practice

2003 vol. 20 no. 4 別冊

Q 熱について

切替照雄

国立国際医療センター研究所感染・熱帯病研究部

東京 文光堂 本郷

Q 熱について

切替照雄

国立国際医療センター研究所感染・熱帯病研究部

◆ はじめに

Q 熱は決して珍しい感染症ではなく、世界中に分布している最も重要な動物由来感染症の一つです。疾患名がちょっと変わっていて「ミステリアスな疾患」という感じですが、実は、疾患名の Q は「？」の意味の query を意味しています。したがって、Q 熱という病名は、「Query fever = 不明熱」に由来しています。ネコなどのペットを飼っていて、インフルエンザ様の症状があり、その後も発熱が長引くような患者がいたら Q 熱を疑ってみてください。これまでの検討から、予想以上に多くの Q 熱感染が日本で起きていると考えられています。しかし、未だ実態は明らかではなく、まさに「ミステリアスな疾患」です。

◆ Q 熱の発見

感染症学の分野で、オーストラリアはときどきすごい研究成果がでます。例えば、ヘリコバクター・ピロリ菌の発見があります。1982 年、オーストラリア西部のパースで、Warren と Marshall がヘリコバクター・ピロリ菌の培養に成功しています。Q 熱が発見されたのは、オーストラリアの北東部のクイーンズランド州です。1935 年、同州で屠畜場の従業員や酪農家の間で原因不明の熱性疾患が流行しました。調査を行った Derrick は、この疾患が今まで報告例のない新しい疾患であると考え “query”

の Q をとって Q 熱と命名しました。Derrick は、患者の血液をモルモットに接種すると、このモルモットが発症し、脾臓や肝臓から病原体が検出されること、これらの病原体をさらに健康なモルモットに継代することができることなどを観察しています。1937 年、これらの結果を論文に発表しています。Derrick と共同研究をしていた Burnet と Freeman はこの病原体がリケッチアであることをつきとめ、同じ雑誌に発表しています。Derrick は、この病原体を Burnet の名前をとって、*Rickettsia burnetii* と命名しています。

同じころ、米国では、Davis と Cox がマダニの抽出物を接種したモルモットからリケッチアを分離しました。その後この二つが同一種の微生物であること、また従来のリケッチア属の他の菌種とは性状が大きく異なることが明らかとなり、Cox と Burnet の名前をとって、*Coxiella burnetii* と命名されました。病原体の名前は、発見者の名前をつけることが多いのですが、Q 熱の場合は、疾患の発見者であり、原因菌の分離に成功した Derrick の名前がはじめから抜けています。このためか、多くの感染症学の教科書で、彼の名前が記載されていません。彼はその後も Q 熱に関する疫学などで重要な研究を残しています。

◆ 病原菌の性質、感染経路そしてバイオテロ

Q 熱の起因菌である *C. burnetii* は、リケッチア科に属している細菌で、他のリケッチアと同様に細胞内でのみ増殖できる偏性細胞内寄生細菌で、人工培地では増殖できない性質を持っています。Derrick が実験動物を用いて分離した方法は、今でも分離の唯一の方法です。他のリケッチア症として、日本ではツツガムシ病や発疹チフスが有名です。

C. burnetii の宿主は、ウシ、ヒツジやヤギなどですが、他のさまざまな家畜、イヌ、ネコなどのペット、シカなどの野生動物、動物に寄

生しているダニなどに感染します。感染動物は唾液、乳汁、排泄物などを通して大量の病原体を散布し環境を汚染しています。外界における *C. burnetii* は他のリケッチアとは大きく異なり高い感染性を維持し、環境の変化にも強い抵抗性を示すため容易に汚染が広がる危険性を含んでいます。病原体を含むエアロゾルを吸入すること、または汚染食品を経口摂取することで感染します。ダニによる感染やヒトからヒトへの感染はまれです。

この菌のもう一つの特徴は、感染性が強いこと、熱や乾燥に比較的強いこと、ヒトに空気感染させることができることから、生物兵器として使用される可能性が考えられることです。

◆ 臨床症状

潜伏期は一般的には14～26日で、突然の発熱、頭痛、筋肉痛、全身倦怠感、軽度咳嗽などインフルエンザ様症状で発症します。発熱は通常9～14日間続き、このため消耗が激しい。30～50%で肺炎がみられます。肝炎、髄膜炎症状を呈することもあり、その臨床像は多彩です。他のリケッチア症と異なり、皮疹がみられることはまれです。ほとんどの患者は、無治療でも数ヵ月以内に完全に回復します。急性Q熱患者の1～2%が死亡します。

急性型Q熱に対して、6ヵ月以上感染が持続する慢性型Q熱はまれですが、より重症です。急性型から早くて1年、長ければ20年たって発症すると考えられています。初期感染が不明の場合も多数あります。慢性感染症で最も問題となる合併症は心内膜炎です。65%以上の慢性型Q熱は予後不良です。最近、慢性肝炎の病態のQ熱も推定されています。

◆ 日本のQ熱

わが国での最初のQ熱の症例は、輸入感染症として報告されました。39歳の医師が留学先のカナダでヒツジの胎児や新生児を扱う実験

に従事し、1987年9月に帰国、11月に発症しています。このときは、留学先でQ熱を発症する同僚がいたという情報があり、また、鹿児島大学細菌学教室が患者血清をマウスに接種して病原体を分離したなどの幸運が重なり、適切に診断できています。これを契機に、血清学的調査を行ったところ、国内の乳牛の約30%、獣医師の約20%が抗*C. burnetii*抗体陽性という結果が得られています。その後の調査でもQ熱病原体がわが国にも広く浸透していることが示唆されるようになってきました。最初の国内発症例は、1993年静岡県衛生環境センターから報告されています。静岡県内でインフルエンザ様症状を呈した学童55名の血清中18検体に抗体価の上昇を認め、うち13例の急性期血清をマウスに接種することで、*C. burnetii*を分離しています。

感染症法による届出によると、1999年12名、2000年23名、2001年40名、2002年46名の患者が報告され、増加傾向にあります。また、地域では、東京都が35人と圧倒的に報告数が多く、北海道と東北をあわせて2名、大阪や京都など関西圏では1名の報告しか出ていません。国立感染症研究所の小川基彦先生のお話ですと、ほとんどが散発例でペットとの関連が示唆されるものが多いそうです。

この実際の届け出患者数や東京に偏在することなどと、Q熱病原体の疫学調査とは全く矛盾しています。この原因として、不顕性感染もしくは軽症のQ熱感染者が非常に多い、インフルエンザ様疾患として見逃されている、などが考えられますが、日本における実態はまだ不明です。いずれにしても、熱性疾患ではQ熱も念頭において診察する必要があります。

◆ 診断と治療

Q熱に特徴的な症状や所見がないため、臨床的にほかの熱性疾患や細菌性心内膜炎と鑑別することは困難です。したがって、上記のような